



OrderPatent

(18)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 02188532 A

(43) Date of publication of application: 24.07.1990

(51) Int. Cl. A61K 39/00

A61K 9/127, G01N 33/544, G01N 33/574

(21) Application number: 01009236

(22) Date of filing: 17.01.1989

(71) Applicant: OTSUKA PHARMACEUT CO LTD

(72) Inventor: SUNAMOTO JUNZO
SHIYUKU HIROSHI

(54) LIPOSOME VACCINE

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a liposome vaccine having remarkable tumorproliferation suppressing effect and useful also for the preparation of antibody for cancer diagnosis by reconstituting an antigen-presenting glycoprotein existing on the surface of a cancer cell into a specific liposome.

CONSTITUTION: A liposome is prepared by using a lipid having amide group capable of forming a hydrogen bond band in a membrane, a synthetic lipid having dipeptide bond near the polar head (preferably yolk lecithin or dimyristoyl phosphatidylcholine) in combination with 1,2-dimyristoylamide-1,2-daoxyphosphatidylcholine. An aqueous solution of an antigen-presenting glycoprotein existing on the surface of a cancer cell is mixed to a suspension of the above liposome to obtain the objective liposome vaccine.

COPYRIGHT: (C)1990 JPO&Japio

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-188532

⑬ Int. Cl.⁴

A 61 K 39/00
9/127
G 01 N 33/544
33/574

識別記号

ADU H
L
A
B

庁内整理番号

8829-4C
7624-4C
7906-2C
7906-2C

⑭ 公開 平成2年(1990)7月24日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 リボソームワクチン

⑯ 特 願 平1-9236

⑰ 出 願 平1(1989)1月17日

⑱ 発 明 者 砂 本 順 三 滋賀県草津市若草2-14-1

⑲ 発 明 者 珠 玖 洋 長崎県長崎市エミネント葉山町11-6

⑳ 出 願 人 大塚製薬株式会社 東京都千代田区神田司町2丁目9番地

㉑ 代 理 人 弁理士 三 枝 英二 外2名

明 細 書

発明の名称 リボソームワクチン

特許請求の範囲

① 癌細胞表面に顕在する抗原提示糖蛋白質を、

1. 2-ジミリスチルアミド-1. 2-デオキシホスファチルコリンを含むリボソームに再構成させてなることを特徴とするリボソームワクチン。

発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、リボソームワクチン、より詳しくは癌細胞表面に顕在する抗原提示糖蛋白質を特定のリボソームに再構成させてなるリボソームワクチンに関する。

従来技術とその問題点

1960年中期に英国のバンガム(Bangham)が天然物由来のリン脂質を水中に再分散させたとき、細胞の形質膜と同じ基本構造の二分子膜が形成さ

れ、これが細胞のバルク構造と同じ閉鎖型小胞形態を有することを見出して以来、該小胞は脂質(lipid)からなる小胞(some)という意味からリボソーム(liposome)と呼ばれ、膜モデルとして乃至はマイクロカプセルとして、膜の流動性やバリアー能(膜透過障壁)等の細胞膜構造特性の研究材料や、また凝集、融合等の細胞の動物膜能研究等に広く利用され盛んな研究が展開されてきている。

上記リボソームは、両親媒性脂質分子の非共有結合性集合体であり、このことから脂溶性(疎水性)分子の膜内への侵入、イオン吸着、温度変化に伴う脂質膜のゲル-液晶相転位、内外水相間の浸透圧バランスの崩れ等の物理化学的振動を起こすことはもとより、脂質分子の化学的・酵素的分解、不飽和脂質の過酸化等による膜構造の不安定化を起こし、それと共に水の膜外流出、膜内流入や、膜内に存在させてカプセル化された水溶性薬

剤、特に低分子薬剤の漏出をも起こし得、之等の点より、例えば組織指向性薬物運搬体、人工赤血球、細胞修飾剤、酵素固定化基材、人工細胞等として医薬品分野を初めとする各種の分野で積極的利用が大きい期待されてきた。しかるに、従来のリポソームは、この水溶性物質のカプセル化効率、保持能力等の低さ、即ちリポソーム膜のバリアー能の低さを致命的欠点としていた（例えば、J. Sunamoto and K. Iwamoto, CRC Critical Review, 2, 2, 117 (1986) 参照）。

上記従来のリポソームの欠点は、リポソーム膜中に膜蛋白質等を組込むことにより解消されると考えられるが、これはリポソーム膜中での膜蛋白質の保持、安定性の面で必ずしも満足できるものではなかった（例えば S.L. Cook, S.R. Bouna, W.H. Huestis, Biochemistry, 19, 4601 (1980) 参照）。

本発明者らも従来より上記リポソームの構造強

するのみで脂質分子膜の構造安定性を向上できるものであり、人工細胞等の用途としてより有効なものと考えられた（例えば H. Goto, H. Arakawa, T. Sato, H. Kondo, J. Sunamoto, Chem. Lett., 19, 1935 (1987) 参照）。

本発明者らは、上記出願に係わるリポソームの応用面の研究を更に引き続き重ねた結果、従来より細胞間の情報伝達に極めて重要な役割を演じており、特に癌の免疫療法において古くから注目されているが、いまだ有効な抗原として確立されていない癌細胞表面の抗原提示糖蛋白質 (Tumor Surface Antigen Present Protein, 以下「TSAP」と略記する) に着目し、これを上記リポソームに再構成した結果、得られるリポソームはワクチンとして非常に有効であり、その適用によって癌の新しい治療法が確立できることを見出し、ここに本発明を完成するに至った。

問題点を解決するための手段

化と分子認識機能発現とを同時に達成し得る技術を提供することを目的として鋭意研究を重ねてきたが、その過程で天然における境界脂質の一種と考えられているスフィンゴミエリンの部分構造アナログとして、アシル鎖中にアミド結合を有する 1, 2-ジミリスチルアミド-1, 2-デオキシホスファチジルコリン（以下「DDPC」という）を設計合成し、これがアミド結合に由来する二分子膜中での水素結合帯形成によって極めて安定な二分子膜を形成することを見出し、この知見に係わる発明を完成し特許出願した（特開昭61-267509号公報）。

上記出願に係わるスフィンゴミエリン含有リポソームは、生体投与時でもその安定性は、通常のホスファチジルコリンリポソームよりも優れており、更に DDPC は天然のスフィンゴミエリンよりも構造的に単純で、また二分子膜中での水素結合帯の形成により、ホスファチジルコリンと混合

即ち、本発明は癌細胞表面に類する抗原提示糖蛋白質 (TSAP) を、1, 2-ジミリスチルアミド-1, 2-デオキシホスファチジルコリン (DDPC) を含むリポソームに再構成させ、なることを特徴とするリポソームワクチンに係わる。

本発明ワクチンは、これを生体に投与することによって生体を免疫化させ得、かくして生体の癌に対する抵抗性を強化し、もって癌の新しい予防及び治療法を確立できる。即ち、本発明ワクチンで免疫化された生体は癌細胞の皮内移植試験によっても全く発癌及び癌細胞の増殖を認めず、優れた免疫効果を奏し得る。

本発明はかかる優れた免疫効果を奏し得るリポソームワクチンの製造方法をも提供するものであり、また本発明ワクチンは癌診断用抗体の調製にも非常に有効である。

以下、本発明リポソームワクチンにつき、これ

をその製造法より詳述すれば、該ワクチンは TSA P を、DDPC を含むリボソームに再構成させることにより製造できる。

ここで使用される TSA P は、各種の癌細胞より通常の方法により調製することができる。その起源とする癌細胞も特に限定されるものではなく、各種動物、ヒトの可移植性癌細胞、癌患者等から手術等により切除された癌細胞乃至白血病細胞のいずれでもよい。特に好ましい代表的癌細胞としては、例えばマウス白血病細胞 (Balb RVD) (例えば H. Morishita, H. Shiku, K. Horibe, Y. Obata, E. Stockert, H. T. Oettingen, L. J. Old, K. Yamada, J. Exp. Med., 163, 452 (1986) 参照) を例示できる。之等癌細胞からの TSA P の調製は、代表的には通常の細胞膜脂蛋白質の抽出操作に仿うことができる。該抽出操作に利用される溶媒も特に限定されるものではなく、一般的な各種のもの、例えば水、メチルアルコール、エチルア

ルコール、プロピルアルコール、ブチルアルコール等の低級アルコール類等や之等と PBS との混液等を利用できる。また上記抽出操作は、通常 0 ~ 50℃ の温度条件下に 1 ~ 30 分間程度インキュベートすることにより実施され、この抽出後、遠心分離等の常法により、上清として所望の TSA P 抽出液を得ることができる。該抽出液はまた常法に従い、必要に応じて適宜減圧濃縮、凍結乾燥、透析等を行なって更に濃縮精製することもでき、通常之等精製操作の採用が好ましい。本発明では上記抽出操作及び必要に応じて更に精製操作を行なって得られるものを利用するが、本発明のリボソームワクチンの製造における TSA P は、上記抽出等を行なうことなく、起源癌細胞が有する TSA P をそのまま、即ち該癌細胞のまま利用できる場合もある。

本発明において上記 TSA P の再構成に用いられるリボソームは、DDPC を含むリボソームで

ある限り特に限定されるものではなく、その代表例としては、本発明者の先の出願 (特開昭 61-267509 号公報) に開示する方法により得られるものを例示できる。より詳しくは上記リボソームは、通常のリボソーム形成用リ脂質と上記 DDPC とを利用して、それ自体公知の各種方法、例えば代表的にはボルテックス法 (Vortexing method) 又は Hydration method (Bangham, A. D., Standish, H. M. & Watkins, J. C. J. Mol. Biol., 13, 238 (1965)) に従って実施できる。上記リボソーム形成用脂質としては、より具体的には例えば、大豆、卵黄等から抽出、精製されたレシチン、スフィンゴミエリン等の膜中で水素結合帯形成を行ない得るアミド基を有する脂質、極性頭部近くにジペプチド結合を有する合成脂質 (DDPC 等)、好ましくは卵黄レシチン、グリシトイルホスファチジルコリン (DMPC) 等を例示できる。上記において、特に好ましいリボ

ソームは、卵黄レシチンと DDPC とを併用するか又は DDPC と DMPC とを通常約 4 : 6 (重量比) で併用して調製される。

上記 TSA P によるリボソームの再構成は、基本的には、両者を単に混合することにより、即ち、リボソーム懸濁液に所定量の TSA P 水溶液を添加混合することにより実施できる。また癌細胞自体を利用する場合は、上記と同様にリボソーム懸濁液中に癌細胞の適量を添加してインキュベート後、癌細胞を遠心分離等の適当な手段で除去することにより目的とする所望のリボソームを得ることができる。上記におけるリボソームに対する TSA P の添加量は、得られるワクチンの活性発現能と関連して非常に重要であり、一般には 1 ml 中のレシチン 100 μg に対して約 200 μg の蛋白質量程度とするのが好ましい。

かくして得られるリボソームはそのまま本発明リボソームワクチンとして利用できる。勿論必要

に応じて、常法に従い滅菌等の操作を施すこともできる。

本発明リボソームワクチンは、従来公知の他のワクチンと同様に、その所定量を動物に投与することにより、該動物を免疫化することができる。該ワクチンを適用され得る動物は特に限定はなく、ヒトを初めとする各種の哺乳動物、その他の動物のいずれでもよい。また之等動物の本発明ワクチン投与による免疫化も、一般的方法に従うことができる。本発明ワクチンの投与経路としては、皮下注射が一般的であるが、特にこれに限定されるものではない。上記免疫化に当たっての本発明ワクチンの投与量は、適宜決定できるが、通常投与量はTSAPとして0.01単位/マウス程度の量を目安とすることができる。尚、このTSAPの1単位は、 2×10^8 Balb RVD細胞から抽出される抗原性蛋白質量として表わされる。上記免疫化は、またワクチンを約0.01~

10単位/個体となる量で、1~2週間に1~4回程度投与することにより行なわれるのが適当である。

実 施 例

以下、本発明を更に詳しく説明するため実施例を挙げる。

実施例 1 リボソームワクチンの調製

1) TSAPの抽出

10匹のBALB/cマウス腹腔内で培養したRVD(白血病細胞)細胞 $5 \sim 10 \times 10^6$ 個を採取し、これを1000rpmで5分間遠心分離し、細胞ペレットを得た。このペレットに同体積の0.83%NH₄Cl水溶液を加えて混濁する赤血球を溶血させ、1000rpmで5分間遠心分離して除去した。この操作は赤血球が完全に溶血するまで数回繰返した。

次いで得られた細胞ペレットに2.5%n-ブタノール-PBS溶液を細胞 5×10^7 個当たり

100μl添加して混合し、室温で7分30秒インキュベートした。その後、1000rpmで5分間遠心分離を行ない、更に得られた上澄を2000rpmで10分間遠心分離し、その上澄をTSAPとして得た。

このTSAP溶液約100~200μlを、PLAT限外濾過機(ミリポア社製)で約5~10倍に濃縮し、濃縮液を200倍容量のPBSに対して室温で2時間透析して、TSAP濃縮液(138μgTSAP/1単位/1μl)を得た。

2) リボソームの調製

卵黄から文献記載の方法(W.S.Singleton, H.S.Gray, H.L.Brown, J.L.White, J. Am. Oil Chem. Soc., 42, 53 (1965))に従い卵黄ホスファチルコリン(EggPC)を抽出し、アルミナカラムを用いて精製した。その純度はTLCにより確認した。

また、2,3-ジアミノプロピオン酸から得

る61-267509号公報(砂本順三ら、日本化学会誌, 1987(3), p569-574)記載の方法により、DDPCを合成した。

上記EggPCの10.6mgとDDPCの7.0mgとを混合し、ナス型フラスコ中で2mlのクロロホルム中に溶解させた。ロータリーエバポレータを用いてクロロホルムを減圧下に留去し、更に減圧デンケーター中で一夜放置した。

次いで得られた溶液をボルテックスミキサー上でPBS(pH7.38)の1mlに懸濁させ、測り量した。その後、UR200Pプローブ型超音波破砕機(トミー社製)を用いて、窒素ガス気流下に5分間、0℃で、25Wで超音波照射して、所望のリボソーム懸濁液を得た。

3) リボソームワクチンの調製

上記1)で調製したTSAP濃縮液1μlと上記2)で調製したリボソーム懸濁液1μlとを混合し、37℃で24時間インキュベートして、本発明の

リボソームワクチン懸濁液を得た。

実施例 2 リボソームワクチンの調製

1) リボソーム懸濁液の調製

DMPCの38.0mgとDDPCの24.0mgを用いて、前記実施例1の2)と同様にして溶液を調製し、これにPBS 2mlを加えてボルテックスミキサーをかけ、その後、UR200Pプローブ型超音波破碎機を用いて、窒素ガス気流下に5分間、37℃で超音波照射して、所望のリボソーム懸濁液を得た。

2) リボソームワクチンの調製

上記1)で調製したリボソーム懸濁液1.5mlとBalb RVD1. 5×10^8 細胞とを混合し、37℃で1時間インキュベートした後、0.8 μ mのフィルターで細胞とリボソームとを分離して、本発明のリボソームワクチン懸濁液を得た。このものがTSAPを含むことは、SDS-PAGEにより確認された。

例において腫瘍直径が10mmを超えた。

またTSAP単独投与群では、TSAP0.1単位投与群(1単位 = 2×10^8 細胞から抽出した抗原量)において5例中2例が、0.01単位投与群において5例中3例が、生理食塩水投与対照群と同様に腫瘍径が10mmを超えた。

之等に対して、本発明のリボソームワクチン投与群においては、該ワクチン0.01単位投与群(1単位 = 2×10^8 細胞から抽出した抗原量)において、腫瘍の増殖は全く認められず、顕著な腫瘍増殖抑制効果を奏することが確認された。

(以上)

代理人 弁理士 三 枝 英 二



実施例 3 リボソームワクチンの効果

16週令のCB6F₁雄性マウス(平均体重20~25g)1群5匹に、各種濃度(0.01単位又は0.1単位TSAP)の実施例1で調製したリボソームワクチン懸濁液を、2週間間隔で2回皮下に投与して免疫し、最終投与から2週間後に、供試動物の背部皮下にRVD細胞 2×10^5 個を移植した。

その後、移植したRVD細胞のコロニーの直径を経時的に測定して、リボソームワクチンの効果を判定した。

比較及び対照として、リボソームワクチン懸濁液に代えて、TSAP及び生理食塩水をそれぞれ同様に投与した群を設けた。

腫瘍移植10日目における腫瘍径(mm)を以下の式により求めて効果の判定を行なった。

$$\text{腫瘍径 (mm)} = (\text{短径} + \text{長径}) / 2$$

その結果、生理食塩水投与対照群では5例中4